Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. W. Zilliken

Freie Nucleotide und Metabolite im braunen Fettgewebe des Meerschweinchens

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Bärbel Sonneborn, geb. Palm
aus Oberhausen/Rhld.

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. W. Zilliken

Freie Nucleotide und Metabolite im braunen Fettgewebe des Meerschweinchens

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Bärbel Sonneborn, geb. Palm
aus Oberhausen/Rhld.

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 14. 7. 1969

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan : Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson
Referent : Prof. Dr. med. Dr. phil. H. -J. Hohorst
Correferent : Prof. Dr. med. W. Schmid

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II.	ERGEBNISSE	
	1. Freie Nucleotide	4
	2. Metabolite des Energiestoffwechsels	13
III.	EXPERIMENTELLER TEIL	
	1. Gewinnung der Gewebsproben und ihre Fixierung	20
	2. Extraktion der säurelöslichen Nucleotide	21
	3. Anionenaustausch-Chromatographie	23
	4. Bestimmungen durch enzymatisch-optischen Test	27
IV.	DISKUSSION	37
V.	ZUSAMMENFASSUNG	40
VI.	ABKÜRZUNGEN	42
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	44
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	51
	Lebenslauf	52

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Bei Winterschläfern und bei Neugeborenen vieler Säugetierarten findet man außer dem gewöhnlichen Speicherfettgewebe auch noch sogenanntes "braunes" Fett, das seinen Namen seiner starken Durchblutung und seinem hohen Gehalt an Atmungspigmenten verdankt.

Dieses Gewebe wurde 1551 zum erstem Mal von GRESSNER (11) beschrieben. Es unterscheidet sich vom weißen Fett histologisch durch seinen hohen Protoplasmaanteil : Die Lipide sind als kleine Tropfen multilokulär über die Zelle verteilt und der Kern ist zentralständig, während das weiße Fett polygonale Zellen mit einer großen Fettblase, randständigem Kern und geringerem Protoplasmaanteil zeigt (Abb. 1).

a)

b)

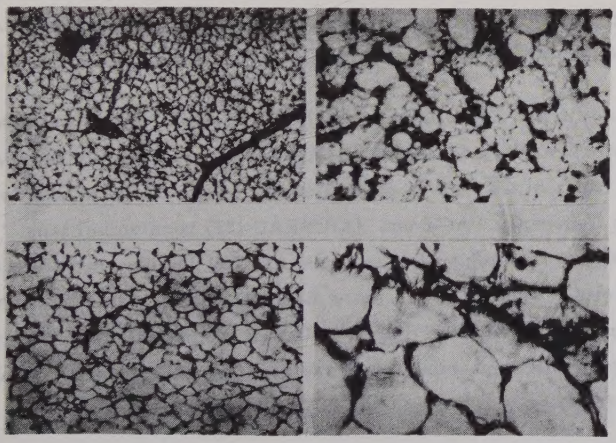

Abb. 1 : Interscapulares Fettgewebe eines neugeborenen (a) und eines 4 Wochen alten Meerschweinchens (b). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Originalvergrößerung 100 bzw. 450 fach (2)

Bei neugeborenen Meerschweinchen beträgt das gesamte braune Fettgewebe etwa 5 % des Körpergewichts (2), wovon ca. 50 % allein im Nacken zwischen den Schulterblättern in einem eigenen Fasciensack als gut zu isolierendes Depot zu finden sind. Dadurch bietet sich das Meerschweinchen für Untersuchungen am braunen Fett als Versuchstier an.
In den ersten drei Wochen der postnatalen Entwicklung des bei 23°C aufgezogenen Meerschweinchens wandelt sich das braune Fett makroskopisch und histologisch in weißes Fett um. BRÜCK und WÜNNENBERG (3, 5) fanden damit korrespondierende, funktionelle Veränderungen : die Fähigkeit zur zusätzlichen Thermogenese bei Kältebelastung oder Noradrenalingabe nimmt in der frühen postnatalen Periode ab. Biochemisch ist diese Umwandlung mit einem starken Abfall der Cytochrome (14), vergl. Abbildung 2, sowie einem Schwund insbesondere der mitochondrialen Enzym-Kapazitäten des Energiestoffwechsels, bezogen auf das Gesamtgewebe, verbunden. Die α-Glycerophosphat-Oxydase beispielsweise ändert sich um eine Größenordnung(32).

Bei Aufzucht in der Kälte unterbleibt diese Altersinvolution weitgehend und das typische Bild des braunen Fettgewebes zeigt sowohl in morphologischer Hinsicht als auch bezüglich seiner enzymatischen Ausrüstung kaum eine Änderung. PAGE und BABINEAU (29) konnten bei langfristiger Kältebelastung an Ratten einen Anstieg der Gesamtmasse des braunen Fettes, verbunden mit einer Erhöhung des Ascorbinsäuregehaltes, feststellen und SMITH und ROBERTS (37) haben unter diesen Bedingungen außerdem einen Temperaturanstieg im braunen Fettgewebe gemessen.

In Ergänzung zu den Untersuchungen von HOHORST und Mitarbeitern (10, 14, 20) über das Verhalten des Enzymmusters des Energiestoffwechsels während der Altersinvolution des braunen Fettgewebes von Meerschweinchen und bei Kältebelastung erschien es von Interesse,

zu prüfen, ob und wieweit die freien säurelöslichen Nucleotide und die Metabolite des braunen Fettes unter den gleichen Bedingungen Veränderungen ihres Musters zeigen und ob diese eine Charakterisierung der beiden metabolisch verschiedenen Fettgewebstypen, des braunen und des weißen Fettes, erlauben.

II. ERGEBNISSE

II. 1. Freie Nucleotide

Zur Bestimmung der freien Nucleotide werden säurelösliche Gewebsextrakte des braunen bzw. weißen Fettes von Meerschweinchen an stark basischen Anionenaustauschern im Ultramikromaßstab aufgetrennt. Abb. : 3 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm, bei dem die einzelnen Peaks durch Vergleichschromatographie mit bekannten Nucleotiden charakterisiert sind. Durch Ausplanimetrieren der Peaks kann der Nucleotidgehalt in den Gewebsextrakten quantitativ erfaßt werden.

In Tabelle 1 sind die im interscapularen Fettkörper des Meerschweinchens chromatographisch bestimmten säurelöslichen Nucleotide für drei verschiedene Zeitpunkte der frühen Postnatalentwicklung bei Aufzucht in Zimmertemperatur sowie nach Kälteaufzucht und Kälteadaptation (vergleiche Vorbemerkung in Teil IV.) zusammengestellt und mit den entsprechenden Werten aus epididymalem "weißem" Fett des erwachsenen Meerschweinchens verglichen. Man erkennt, daß der Gesamtgehalt des Fettkörpers an freien Nucleotiden im Verlaufe der ersten drei Wochen nach der Geburt bei Aufzucht in neutraler Umgebungstemperatur auf etwa die Hälfte des Geburtswertes abfällt, so z. B. die Summe der Adenin-Nucleotide von 717 nM/g frisch auf 359 nM/g frisch, und daß dieser Schwund der Nucleotid-Gehalte bei Kälteaufzucht respektive nach Readaptation deutlich vermindert ist. Durch den Abfall des Nucleotid-Gehaltes während der postnatalen Involution kommt es also zu einer Annäherung an die niedrigen Nucleotid-Gehalte des weißen Fettgewebes, ohne daß innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 3 Wochen Wärmeaufzucht der Wert des epididymalen Fettes erreicht wird. Im Ganzen entsprechen die Veränderungen den von BRÜCK et al. (2) beschriebenen histologischen Veränderungen, die durch einen zunehmenden Ersatz der multilokulären "braunen" Fett-

zellen mit hohem Protoplasmagehalt durch unilokuläre "weiße" Fettzellen mit geringem Protoplasmaanteil gekennzeichnet sind.

In der Tat scheint der Schwund der freien Nucleotide in der postnatalen Entwicklung im Wesentlichen durch die Verminderung des Protoplasmaanteils der Fettzellen bedingt zu sein.

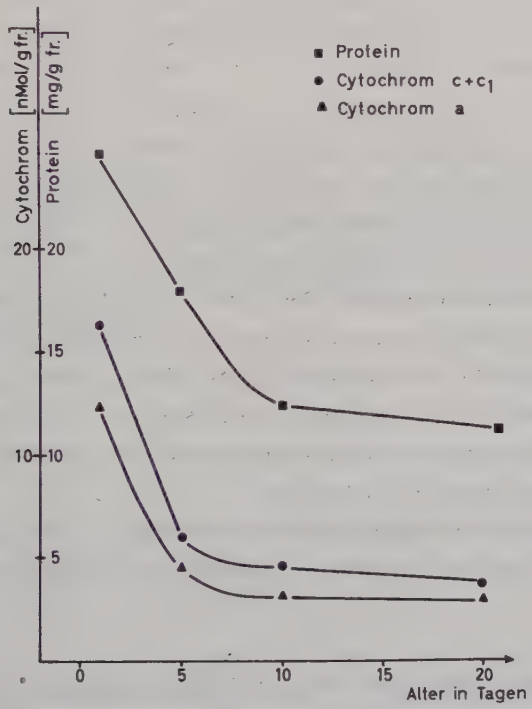

Abb. 2 : Gehalt an Extraktprotein, Cytochrom a (14) und Cytochrom c + c_1 (14) im braunen Fettgewebe des Meerschweinchens während der postnatalen Involution.

Wenn man die gemessenen Nucleotid-Gehalte nicht auf das Frischgewicht der Gewebsprobe bezieht, sondern den Gehalt an löslichem Extraktprotein zu Grunde legt (vergl. Abb. 2), bleibt der Gesamtge-

halt der freien Nucleotide während der postnatalen Involution nahezu konstant, vgl. Tabelle 2. Daraus folgt, daß der Gehalt an freien Nucleotiden und der Gehalt an löslichem Protein im interscapularen Fettkörper während der Altersentwicklung parallel und im gleichen Ausmaß verändert sind.

Vergleicht man den relativen Anteil der freien Nucleotid-Gruppen bei verschiedenen Geweben, geordnet nach der ihre Spezifität bestimmenden Base (Tabelle 3), dann fällt insbesondere der hohe Relativ-Gehalt an Cytidin-monophosphat im braunen Fett auf. Der Gehalt an Cytidin-Monophosphat im braunen Fettgewebe liegt in der Größenordnung der Adenin-Nucleotide, zum Unterschied von allen anderen Geweben, wo er ein bis zwei Größenordnungen unterhalb dem der Adenin-Nucleotide liegt. Der Spiegel des Cytidin-Monophosphates im braunen Fett liegt auch beim Vergleich mit weißem Fett um eine Größenordnung höher. Der relativ hohe Anteil des Cytidin-Monophosphates an der Gesamtfraktion der säurelöslichen Nucleotide ist angesichts des hohen Phospholipidgehaltes des braunen Fettes (8, 9), der mit 86.02 mg P/100 mg Lipide um das Zehnfache über dem P/Wert des weißen Fettes liegt, und in Anbetracht der spezifischen Funktion der Cytidin-Phosphate für die Synthese von Phospholipiden von besonderem Interesse.

Weitere auffällige Abweichungen des Nucleotidmusters von den anderen in der Tabelle aufgeführten Geweben mit spezifischer Funktion sind nicht vorhanden.

Das Fehlen von CDP, CTP, GDP und UDP in Tabelle I bedeutet natürlich nicht, daß diese Nucleotide im interscapularen Fettgewebe nicht vorhanden wären. Sie sind aber mit der hier benutzten Kurzzeit-Chromatographie nicht zu erfassen bzw. abzutrennen. Das Gleiche gilt für weitere Transportmetabolite wie CDP-Cholin, UDP-Glucose, UDP-Galaktose und andere, die sich nur mit wesentlich zeitraubenderen

und aufwendigeren chromatographischen Methoden unter zusätzlicher Verwendung der Hochspannungselektrophorese erfassen lassen.

Das Verhältnis der wasserstoffübertragenden Nicotinamid-adenindinucleotide zu den Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphaten (Tabelle 4) beträgt in braunen Fett des neugeborenen Meerschweinchens mit 1. 7 nahezu den gleichen Wert wie in der Leber, einem Organ mit vergleichbar hoher Lipidsyntheserate. Es ist dagegen erheblich kleiner als in Organen mit hohem Energiestoffwechsel wie Skelettmuskulatur und Gehirn.
Auch beim Vergleich des Gesamtgehaltes an freien Nucleotiden liegt das braune Fett in einer Gruppe mit Geweben mit intensiver Stoffwechselleistung, während der Gesamtgehalt der freien Nucleotide im weißen Fett nur etwa 50 % dieser Werte beträgt (Tabelle 5). Bei diesem Vergleich wurde der unterschiedliche Fettgehalt der Gewebe nicht berücksichtigt.

	1-Tage Tiere n = 10	10-Tage Tiere n = 7	20-Tage Tiere n = 9	Readapt. n = 4	Adapt. n = 4	w. Fett n = 8
NAD	161.2 ± 15.4	59.0 ± 11.6	29.6 ± 6.6	103.3 ± 11.8	107.0 ± 12.3	32.7 ± 2.7
NADP	68.2 ± 6.2	23.1 ± 7.1	22.9 ± 5.6	22.8 ± 9.9	24.7 ± 8.3	--
AMP	156.3 ± 21.0	42.2 ± 11.7	67.4 ± 9.2	100.0 ± 19.0	143.0 ± 21.2	36.8 ± 1.9
ADP	197.3 ± 22.4	119.0 ± 13.0	93.2 ± 9.4	123.2 ± 23.5	152.0 ± 25.2	54.4 ± 2.9
ATP	391.0 ± 28.8	201.3 ± 31.3	203.0 ± 29.3	286.0 ± 30.7	192.0 ± 29.8	93.3 ± 4.3
Σ Ad-P	717.0	363.0	359	509.0	487.0	186.0 ± 5.4
CMP	542.0 ± 32.8	226.0 ±29.7	234.0 ± 36.0	245.0 ± 32.5	72.5	5.2 ± 0.5
GMP	129.8 ± 11.0	64.5± 2.2	32.8 ± 8.2	41.0 ± 7.6	96.1 ± 10.4	7.9 ± 0.7
UMP	282.5 ± 62.3	145.3 ± 34.0	130.6 ± 19.8	156.5 ± 32.2	212.5 ± 10.3	87.8 ± 3.6
GTP	51.3 ± 8.1	31.5 ± 6.0	37.9 ± 9.8	23.9 ± 4.2	20.1 ± 3.9	22.1 ± 1.8
UTP	88.6 ± 19.5	41.6 ± 9.0	52.8 ± 6.7	98.0 ± 17.7	38.7 ± 8.4	14.3 ± 2.1

Tabelle 1 :

Gehalte an freien säurelöslichen Nucleotiden des "braunen" Fettes (Meerschweinchen) bei 1-Tage, 10-Tage und 20-Tage alten Tieren, nach Kältereadaptation und bei Kälteadaptation, verglichen mit dem Nucleotid-Gehalt des "weißen" Fettes.
Angaben in nMol/g frisch $\pm \frac{s}{\sqrt{n}}$
Chromatographische Bestimmungen.

	1-Tage Tiere n = 10	10-Tage Tiere n = 7	20-Tage Tiere n = 9	Readapt. n = 4	Adapt. n = 4	W. Fett n = 8
NAD	703.0	476.0	239.0	614.0	500.0	255.0
NADP	327.0	186.2	184.5	106.5	115.5	-----
AMP	757.0	340.0	543.0	468.0	668.0	302.0
ADP	847.0	960.0	752.0	568.0	711.0	428.0
ATP	1705.0	1633.0	1635.0	1337.0	895.0	718.0
ΣAd-P	3075.0	2930.0	2900.0	2378.0	2280.0	1450.0
CMP	2312.0	1825.0	1885.0	1145.0	339.0	40.6
GMP	557.0	520.0	265.0	191.0	449.0	61.7
UMP	1210.0	1170.0	1053.0	738.0	990.0	685.0
GTP	220.0	254.0	305.0	111.8	94.0	173.0
UTP	380.0	336.0	426.0	459.0	180.5	112.0

Tabelle 2 :

Nucleotid-Gehalt des "braunen" Fettes (Meerschweinchen) von 1-Tage, 10-Tage, 20-Tage, kältereadaptierten und kälteadaptierten Tieren (s. III., Vorbemerkung),verglichen mit dem Nucleotid-Gehalt im "weißen" Fett. Angaben in nMol/100 mg Extraktprotein.
Chromatographische Bestimmungen.

	Braunes Fett(Meerschweinchen) 1 Tag	10 Tage	20 Tage	Weißes Fett (Meerschw.)	Muskel* (Ratte)	Linse* (Rind)	Gehirn* (Ratte)	Endokr. Drüsen* (Schaf)	Niere** (Ratte)	Leber*** (Ratte)
Adenosin-Nucleotide	32	35	39	52	96	61	56	45	67	58
Cytidin-Nucleotide	24	21	25	2	1	6	4		4	1
Guanosin-Nucleotide	8	9	8	8	2	10	11-12	12	14	5
Uridin-Nucleotide	17	18	20	28	2	21	11-12	27	15	11
ATP	18	19	22	26	84	38	50	30	24	38

Tabelle 3 :

Nucleotid-Gehalte in verschiedenen Geweben im Vergleich mit weißem Fett und braunem Fett von Meerschweinchen verschiedener Altersgruppen.

Angaben in Prozent, bezogen auf den Gesamtgehalt an freien säurelöslichen Nucleotiden.

* nach MANDEL (28)

** nach SAUKONNEN (33)

*** nach HELDT (13)

	NAD	NADH	NADP	NADPH	NAD + NADH / NADP + NADPH
Braunes Fett (Meerschweinchen)					
1-Tage Tiere	164	66	76	61	1.7
10-Tage Tiere	59	55	23	44	1.7
20-Tage Tiere	30	10	22	13	1.1
Leber *	640	164	113	316	1.4
Skelettmuskel *	482	111	10	17	21.9
Herz *	720	134	50	91	6.0
Hirn *	377	72	14	28	10.7
Flugmuskel *	475	5	11	8	25.2

Tabelle 4:

Das Verhältnis der wasserstoffübertragenden Nicotinamid-adenin-dinucleotide zu den Nicotinamid-adenin-Dinucleotidphosphaten im braunen Fett des Meerschweinchens während der postnatalen Involution im Vergleich mit dem einiger anderer Gewebe.

Angaben in nMol/frisch.

* nach KLINGENBERG (23)

Braunes Fett (Meerschweinchen)	
1 Tage Tiere	211
10 Tage Tiere	95
20 Tage Tiere	90
n. Kälte-Adaptation	106
n. Kälte-Readaptation	120
Weißes Fett (Meerschweinchen)	36
Skelettmuskel (Ratte)*	825
Leber (Ratte) **	633
Endokrine Drüsen (Schaf)*	125
Linse (Rind)*	320
Niere (Ratte)***	313

Tabelle 5:

Summe der freien säurelöslichen Nucleotide in verschiedenen Geweben, verglichen mit dem Gehalt in "braunem" und "weißem" Fett von Meerschweinchen.

Angaben in µMol/100 g frisch.

* n. MANDEL (28)

** n. HELDT (13)

*** n. SAUKONNEN (33)

II. 2. Metabolite des Energiestoffwechsels

In Tabelle 6 sind die an drei verschiedenen Altersgruppen der frühen Postnatalperiode im interscapularen Fettgewebe des Meerschweinchens bestimmten Metabolitgehalte des Embden-Meyerhof-Systems sowie Creatinphosphat, Creatin und Glucose verzeichnet. Wie bei den freien säurelöslichen Nucleotiden machen auch hier einige der Metabolite, und zwar Creatinphosphat und Creatin, Glucose-6-phosphat und Fructose-1.6-diphosphat während der ersten drei Wochen nach der Geburt eine Bewegung mit, die parallel zum Schwund des Protoplasmaanteils der Fettzellen verläuft, welcher durch einen Abfall des extrahierbaren Proteins auf etwa die Hälfte des Neugeborenenwertes gekennzeichnet ist (vgl. Abb. 2).

Dementsprechend bleiben die Spiegel dieser Metabolite, wenn sie anstatt auf g frisch auf 100 mg Protein bezogen werden, im Verlauf der postnatalen Involution nahezu konstant. (Tabelle 7). Dagegen steigen die Spiegel anderer Metabolite, insbesondere von Glucose, Malat, Lactat, Pyruvat und auch von Glycogen bei Bezug auf Extraktprotein deutlich an, beziehungsweise sie bleiben zumindest unverändert, wenn sie auf g frisch-Basis berechnet werden. Der Anstieg von Malat und Lactat ist nicht durch eine Veränderung des Reduktionszustandes des NAD/NADH-Systems bedingt, da die dafür repräsentativen Redox-Quotienten Lactat/Pyruvat, α-Glycerophosphat/Dihydroxyaceton-phosphat sowie Malat/Oxalacetat praktisch keine Veränderungen während des gleichen Zeitraumes zeigen (vgl. Tabelle 8).

Auffallend ist die starke Differenz, die sich ergibt, wenn man den Redox-Status der an das extramitochondriale NAD/NADH-System gekoppelten Metabolit-Redoxsysteme Lactat/Pyruvat und α-Glycerophosphat/Dihydroxyacetonphosphat mit den für ein thermo-

dynamisches Gleichgewicht zu fordernden Werten vergleicht (17).
Für das Gleichgewicht gilt :

$$\frac{[NADH] \cdot [H^+]}{[NAD^+]} = \frac{[L]}{[P]} \cdot K_L = \frac{[\alpha\text{-GP}]}{[DAP]} \cdot K_{Glyc.} = \frac{[M]}{[OAA]} \cdot K_M$$

Daraus folgt:

$$\frac{[L]}{[P]} : \frac{[\alpha\,GP]}{[DAP]} : \frac{[M]}{[OAA]} = K_L : K_{Glyc.} : K_M = 1.7 : 1.0 : 0.19$$

Aus den Werten in Tabelle 6 errechnen wir dagegen folgende Werte :
Lactat / Pyruvat = 17.1
α-Glycerophosphat / Dihydroxyacetonphosphat = 1.3
Malat / Oxalacetat = 28.1

Demnach würde das Glycerophosphat-Dihydroxyacetonphosphat-System deutlich stärker oxydiert sein, möglicherweise als Folge einer starken Aktivität mitochondrialer α-Glycerophosphat-Oxydase. Tatsächlich zeigen Mitochondrien aus braunem Fettgewebe eine auffallend hohe Glycerophosphat-Atmung, was von SMITH et al. (37) in Beziehung zur chemischen Wärmebildung, der physiologischen Funktion des braunen Fettgewebes, gebracht wird (vgl. Diskussion).
Die Existenz von Creatinphosphat und Creatin im interscapularen Fettgewebe erscheint zunächst überraschend. Auf den ersten Blick könnte man an eine Verunreinigung mit Muskelgewebe, bedingt

durch die Präparations-Technik, denken. Jedoch scheint die Tatsache, daß der Creatin- und Creatinphosphat-Gehalt während der postnatalen Involution des Fettkörpers parallel zu dem Extraktprotein absinkt, doch mehr auf eine Lokalisation dieser Metabolite im Protoplasma der braunen Fettzellen hinzudeuten.

Beim Vergleich der im braunen Fettkörper gemessenen Metabolite mit denen anderer Gewebe (Tabelle 9), läßt sich das braune Fettgewebe in die Gruppe derjenigen Zellen einordnen, deren Funktion überwiegend auf Energietransformation gerichtet ist, wie Muskel und Hirnrinde, und hebt sich deutlich vom Metabolit-Pattern synthetisierender Organe wie der Leber ab. Besonders kennzeichnend ist hier der Malat-Spiegel.

	1-Tage Tiere	5-Tage Tiere	20-Tage Tiere
Malat	95.9 ± 7.46	95.8 ± 6.28	80.7 ± 4.37
α-GP	29.3 ± 2.01	20.6 ± 2.34	19.8 ± 2.86
Lactat	1109.0 ± 79.10	1143.0 ± 83.64	1068.0 ± 50.32
Pyruvat	66.0 ± 4.05	63.3 ± 1.69	71.6 ± 6.50
DAP	20.0 ± 1.01	19.1 ± 0.17	18.0 ± 5.30
FDP	6.8 ± 0.95	3.4 ± 0.51	3.8 ± 0.43
CP	777.0 ± 23.65	435.0 ± 15.37	374.0 ± 12.22
C	1042.0 ± 39.75	430.0 ± 34.92	333.0 ± 34.64
Glu	990.0 ± 67.38	1706.0 ± 127.61	1797.0 ± 108.00
Gly	1320.0 ± 128.46	1410.0 ± 130.12	1267.0 ± 132.75
G-6-P	84.2 ± 3.37	25.5 ± 1.25	22.1 ± 3.78
OAA	3.4 ± 0.38	—	4.1 ± 0.92
PEP	3.3 ± 0.56	—	3.9 ± 0.63

Tabelle 6 :

Metabolit-Gehalt im "braunen"Fett (Meerschweinchen) von 1-Tage, 5-Tage und 20-Tage alten Tieren.

Angaben in nMol/g frisch. $\pm \frac{s}{\sqrt{n}}$
Bestimmungen im enzymatisch optischen Test.
Einzelheiten s. Experimenteller Teil (III. 4.).

	1-Tage Tiere	5-Tage Tiere	20-Tage Tiere
Malat	412.4	517.3	653.7
α-GP	126.0	111.2	160.4
Lactat	4769.0	6172.0	8651.0
Pyruvat	283.8	341.8	580.0
DAP	86.0	103.1	153.1
FDP	29.2	18.4	30.8
CP	3341.0	2349.0	3029.0
C	4480.0	2322.0	2697.0
Glu	4257.0	9212.0	14556.0
Gly	5676.0	7614.0	10263.0
G-6-P	362.1	137.7	179.0
OAA	14.6	---	33.2
PEP	14.2	---	31.6

Tabelle 7 :

Metabolit-Gehalt im "braunen" Fett (Meerschweinchen) von 1-Tage, 5-Tage und 20-Tage alten Tieren.

Angaben in nMol/100 mg Extraktprotein.
Bestimmungen im enzymatisch-optischen Test.
Einzelheiten s. Experimenteller Teil (III. 4.).

	1-Tage Tiere	5-Tage Tiere	20-Tage Tiere
L/P	17.1	18.0	15.0
α-GP/DAP	1.3	1.0	1.2
M/OAA	28.1	--	20.0

Tabelle 8 :

Red/Ox-Quotienten der mit dem extramitochondrialen NAD/NADH-System gekoppelten Red/Ox-Paare Lactat/Pyruvat, α-Glycerophosphat/Dihydroxyacetonphosphat und Malat/Oxalacetat.

	Braunes Fett (Meerschwein)	Flugmuskel (22) (Locusta micratoria)	Leber(16, 17) (Ratte)	Großhirnrinde(34) (Katze)	Muskel(1 (Ratte)
lat	96	92	433	91	75
GP	29	294	253	38	130
tat	1109	117	1540	830	2060
uvat	66	90	154	65	97
P	20	221	38	21	31
P	7	117	22	23	50
	777	---	---	4430	21200
	1042	---	---	7460	11300
	990	138	6740	---	2530
	1320	---	---	---	29600
-P	84	70	370	---	769
A	3	---	8	---	1.4
P	3	---	117	---	13
D	164	475 *	640 *	377 *	482 *
DH	66	5 *	164 *	72 *	111 *
DP	76	11 *	113 *	14 *	10 *
DPH	61	8 *	316 *	28 *	17 *

Tabelle 9 :

Vergleich einiger Metabolite des "braunen" Fettes neugeborener Meerschweinchen mit dem Metabolitgehalt in verschiedenen Geweben.

Angaben in nMol/g frisch.

* Nach KLINGENBERG (23).

III. EXPERIMENTELLER TEIL

In dieser Arbeit werden für die Untersuchungen am braunen Fett Meerschweinchen unterschiedlichen Alters, die unter wechselnden Bedingungen aufgezogen wurden, verwendet :

1). Bei 23°C (Zimmertemperatur) aufgezogen
   a). Neugeborene bis 1 Tage alte Tiere
   b). 10 Tage alte Tiere (9 - 11 Tage)
   c). 20 Tage alte Tiere (19 - 21 Tage)
2). mindestens 3 Wochen alte Tiere, die sofort nach der Geburt bei 5°C gehalten wurden (adaptierte Tiere).
3). Tiere, die in den ersten 7 Wochen nach der Geburt bei 23°C, anschließend 7 Wochen bei 5°C gehalten worden sind(readaptierte Tiere).

Für die Untersuchungen des weißen Fettes werden ausgewachsene männliche Meerschweinchen verwendet.
Die Gewebsentnahme findet grundsätzlich in Äthernarkose statt.

III. 1. Gewinnung der Gewebsproben und ihre Fixierung

Die Herstellung des säurelöslichen Gewebsextraktes erfolgt analog einem von Hohorst et al. (16) für Lebergewebe beschriebenen Frierstopverfahren.

III. 1. 1. Entnahme des braunen Fettgewebes

Dem Meerschweinchen wird die Rückenhaut zwischen den Schulterblättern vorsichtig abpräpariert, bis das gesamte Paket des interscapularen braunen Fettes freiliegt. Um eine Traumatisierung des Gewebes durch eine vollständige Mobilisation zu vermeiden, werden die Meer-

schweinchen mit einer in flüssiger Luft vorgekühlten Aluminiumzange* gefaßt, deren eine Backe des gesamte Gebiet des interscapularen Fettkörpers umschließt, und sofort in flüssiger Luft eingefroren.
Das braune Fett hebt sich durch seine hellere Färbung deutlich von der angrenzenden Muskulatur ab und kann leicht mit einem kleinen Metallschaber abgeraspelt werden. Dabei darf das Gewebe nicht auftauen. Es wird bis zur weiteren Verarbeitung in flüssiger Luft aufbewahrt.
Die Ausbeute beträgt zwischen 400 mg und 600 mg braunes Fettgewebe pro Tier.

III. 1. 2. Entnahme des weißen Fettgewebes

Nach einem Inguinalschnitt sucht man die Hoden des Meerschweinchen auf. Der daranhängende weiße Fettkörper wird mit zwei Pinzetten an den Enden angehoben, zwischen den Backen einer in flüssiger Luft vorgekühlten Zange eingefroren, vom Hoden getrennt und in flüssiger Luft aufbewahrt. Die von der Zange nicht erfaßten Randteile werden abgebrochen und verworfen. Die Ausbeute liegt bei etwa 5 g Fettgewebe pro Tier.

III. 2. Extraktion der säurelöslichen Nucleotide

Damit das Gewebe zu keinem Zeitpunkt auftauen kann (s. Anmerkung), führt man die folgenden Arbeitsgänge im Kühlraum bei 4°C durch.
Die Gewebsprobe wird in einem vorgekühlten Porzellanmörser unter kräftigem Übergießen mit flüssiger Luft zu einem feinen Pulver zerrieben.

---

* hergestellt in der Werkstatt des Physiol. Chemischen Instituts der Universität Marburg/Lahn.

Dieses wird in der ca. 5-6 fachen Menge eiskalter vorgewogener 6%iger Perchlorsäure aufgenommen und die Einwaage an Gewebspulver durch Zurückwägen bestimmt. Nach 30 sec. Homogenisation im Ultra Turrax * wird 4 min. bei 280 x g zentrifugiert und nach Durchstoßen der auf dem Zentrifugat abgesetzten Fettschicht vom Rückstand abdekantiert. Dieser wird erneut in der 2-3 fachen Menge eiskalter 3 %iger Perchlorsäure aufgenommen und wie oben homogenisiert und zentrifugiert.

Die vereinigten Extrakte werden im Eisbad durch Titration mit 5 N Kalilauge gegen Merck Spezialindikatorpapier pH 6.4 - 8.0 unter kräftigem Rühren zur Vermeidung einer Überneutralisation auf pH 7.0 eingestellt. Man läßt den neutralisierten Extrakt etwa 24 h bei 0°C stehen, damit das gebildete Kaliumperchlorat möglichst quantitativ abgeschieden wird, zentrifugiert dann bei 40 000 x g in der Ultrazentrifuge ** 10 min., um eventuelle Fettrückstände zu beseitigen, und saugt dann über eine Glasfritte G 4 ab. Aus dem genauen Endvolumen nach der Neutralisation und der Einwaage an Gewebe läßt sich die Masse Frischgewebe pro ml Extrakt bestimmen.

Anmerkung: Die Beständigkeit der einzelnen Metabolite im Extrakt ist abhängig von der Aufbewahrungszeit, der Temperatur und dem pH-Wert (16). Da durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Extrakte der Zerfall einzelner Metabolite begünstigt wird, werden die Extrakte für diese Versuche unterhalb von 0°C aufbewahrt und möglichst schnell aufgearbeitet.

---

* Fa. Jahnke und Kunkel, Typ 18/2

** MSE-Ultrazentrifuge High speed 50, Measuring Scientific Equipment, Ltd., London.

III. 3. Anionenaustausch-Chromatographie

III. 3. 1. Herstellung der Austauschersäulen

Stark basischer Anionenaustauscher Dowex 2 X 8, ausgesiebt im Bereich 45 - 60 Mikron *, wird mit 8 N Ameisensäure in die Formiatform überführt, mit bidest. Wasser neutral gewaschen und in Glassäulen, 4. 1 mm ∅ und 70 cm Länge, unter Druck eingefüllt, um ein gleichmäßiges Absetzen des Harzes zu gewährleisten. Die gefüllte Säule wird über eine Schlauchquetschpumpe ** 48 Std. lang bei einem Druck von 3 - 5 kg/cm^2 und ca. 30 ml/h Elutionsgeschwindigkeit mit bidest. Wasser behandelt.

III. 3. 2. Chromatographie

Je nach Nucleotid-Gehalt werden zwischen 0. 5 ml und 10 ml des neutralen säurelöslichen Gewebsextraktes auf die Säule gepumpt und die beladene Säule anschließend mit eisgekühltem bidest. H_2O gewaschen bis die Extinktion des Eluates den Basiswert erreicht, wozu etwa 90 ml verbraucht werden.

Die Extinktionsmessung des Eluats erfolgt entweder bei 260 nm im Beckman Spektralphotometer DK 1 oder bei 260 nm und 280 nm gleichzeitig im Zeiss-Spektralphotometer PMQ 2 mit Wellenlängenwechselautomatik und 100-Punkt-Automatik zur Justierung des Photometers. Für die kontinuierliche Extinktionsmessung durchfließt das Eluat eine Mikrodurchflußküvette (1 cm Schichtdicke, 7.8×10^{-3} ml Volumen)***.

---

* Fa. Serva (Heidelberg)

** hergestellt in der Werkstatt des Physiol. -Chem. Inst. der Universität Marburg/L.

*** hergestellt in der Werkstatt des Physiol. -Chem. Inst. der Universität Marburg/L.

Die Extinktion wird fortlaufend mit einem angeschlossenen Schreiber * registriert (Abb. 3).

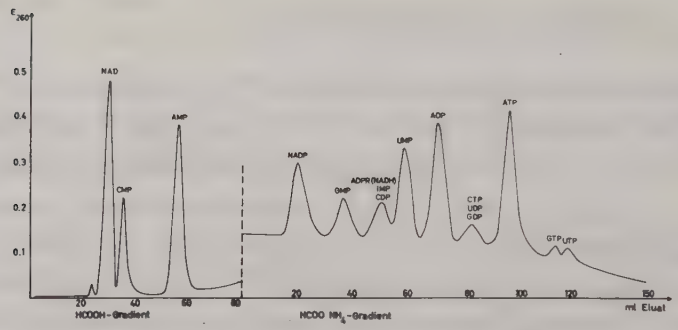

Abb. 3 : Chromatogramm des braunen Fettgewebes (C 31)

440 mg Frischgewebe vom 1 Tage alten Meerschwein
Gradient I : 50 ml H_2O/50 ml H_2O/50 ml 8 N HCOOH
Gradient II : 50 ml 4 N HCOOH/50 ml 4 N HCOOH/50 ml 1 N $HCOONH_4$
Säule : 4 x 700 mm; Dowex 2 x 8, 45-55 μ $HCOO^-$

III. 3. 3. Elution

Um die Nucleotide unter den günstigsten Bedingungen zu eluieren und soweit wie möglich aufzutrennen, wird ein konkaver Ameisensäure- bzw. Formiatpuffer-Gradient verwendet.
Mit dem Ameisensäure-Gradienten wird bis über den Durchbruch von AMP hinaus bis zu ca. 80 ml Elutionsvolumen eluiert. Die nachfolgenden

* Modell RikaDenki, Firma Hellige, Freiburg

Nucleotide werden mit einem Formiatpuffer-Gradienten eluiert. Der konkave Gradient wird in einem aus drei miteinander kommunizierenden Kammern bestehenden Gradienten-Mischgerät * eingestellt. Den Aufbau dieses Gradienten-Mischgerätes zeigt Abb. 4. Das Schema der gesamten Chromatographie-Anlage ist aus Abb. 5 zu ersehen.

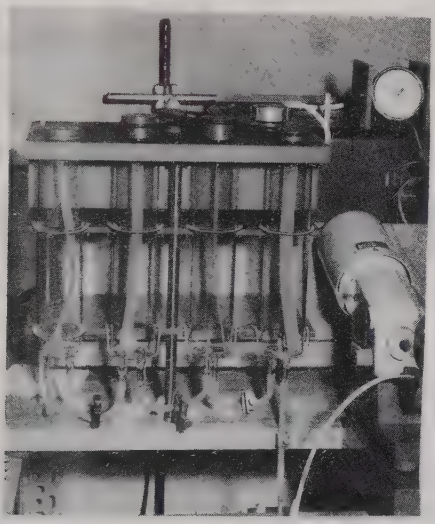

Abb. 4 : Gradienten-Mischgerät

Füllun g der Kammern :

Ameisensäure-Gradient:

Kammer I : 50 ml bidest. H_2O

Kammer II : 50 ml bidest. H_2O

Kammer III : 50 ml 8 N Ameisensäure

Formiatpuffer-Gradient :

Kammer I : 75 ml 4 N Ameisensäure

Kammer II : 75 ml 4 N Ameisensäure

Kammer III : 75 ml 2 N Ammoniumformiat

* hergestellt in der Werkstatt des Phys. Chem. Inst. der Universität, Marburg/Lahn.

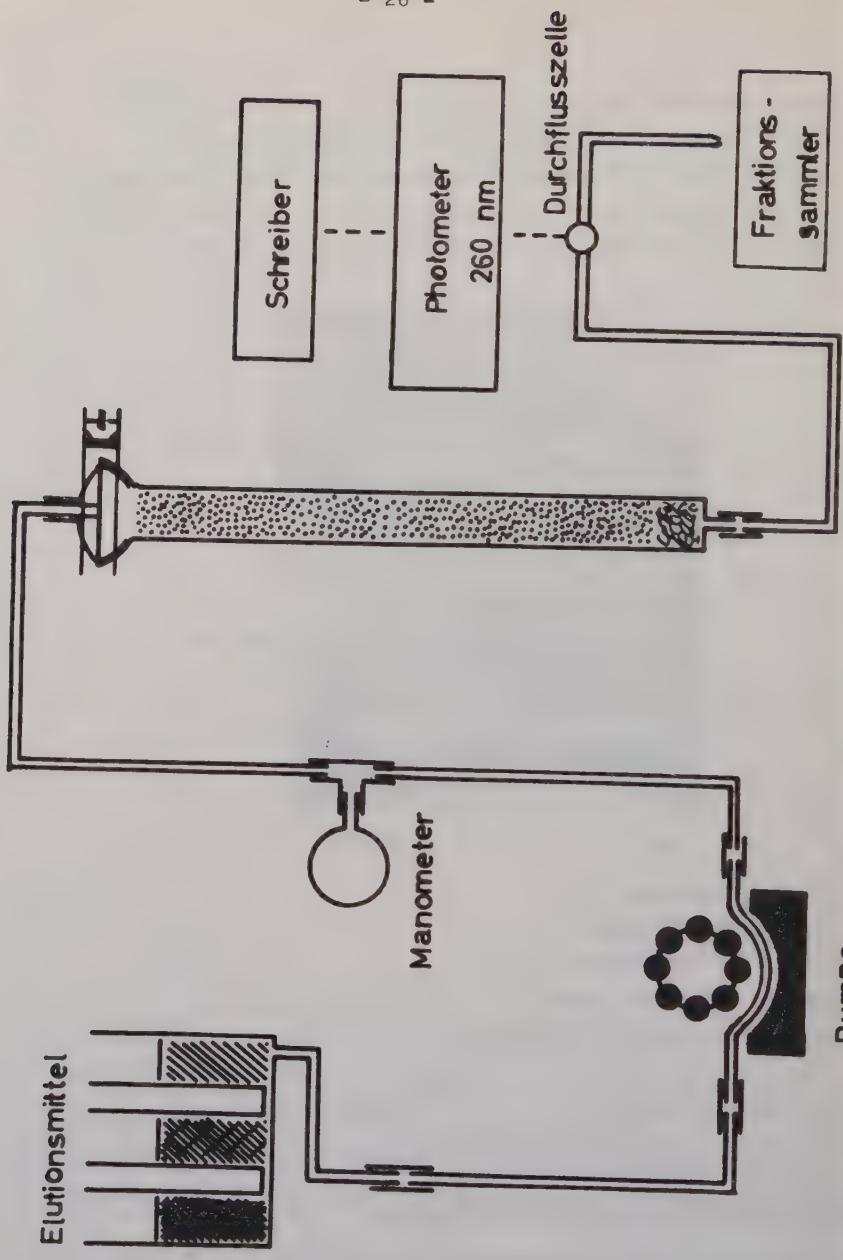

Abb. 5: Schema der Chromatographie-Anlage

Der Verlauf des Gradienten wurde am Beispiel des Ameisensäure-Gradienten potentiometrisch überprüft. Dazu wird mit einem registrierenden pH-Meter * der pH-Wert in der ersten Kammer während der Chromatographie registriert (Abb. 6).

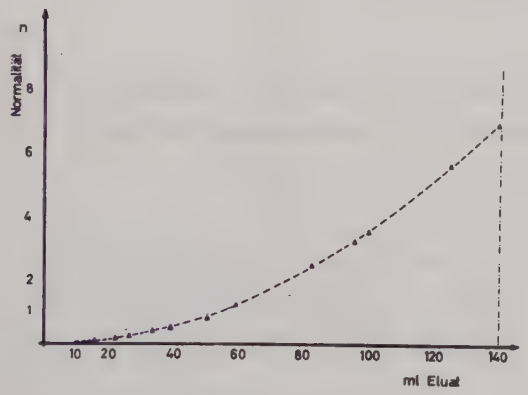

Abb. 6 : Verlauf des konkaven Säuregradienten

III. 4. Bestimmung im enzymatisch-optischen Test.

Die Konzentration einiger Metabolite wurde nach dem Prinzip von WARBURG (42) im enzymatisch-optischen Test bestimmt. Die Messung erfolgt,sofern nicht anders beschrieben,im registrierenden Photometer Eppendorf ** bei einer Wellenlänge von λ = 334 nm, Schichtdicke der

---

* Knick, pH-Meter Typ 290 mit Mikroglaselektrode Ingold, Typ 405 und angeschlossenem Hartmann u. Braun, Schreiber Typ Elaviscript 3

** Fa. Netheler und Hinz, Hamburg.

Küvette d = 1 cm und 25°C. Zur Berechnung wird folgender Extinktionskoeffizient zugrunde gelegt:

$$\varepsilon_{334} = 6.09 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

bzw. für eine Wellenlänge von λ = 340 nm :

$$\varepsilon_{340} = 6.28 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

a). Bestimmung von L(-)Malat, L(-)Glycerin-1-phosphat und L(+)Lactat im "kombinierten" enzymatischen Test (15, 16).

Reaktion :

$$\text{Malat} + \text{NAD}^+ + \text{Hydrazin} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Oxalacetat-Hydrazon} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\alpha\text{-GP} + \text{NAD}^+ + \text{Hydrazin} \xrightarrow{\text{GDH}} \text{DAP-Hydrazon} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\text{Lactat} + \text{NAD}^+ + \text{Hydrazin} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvat-Hydrazon} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Testzusammensetzung :

0.5 ml Gewebsextrakt
0.45 ml Hydrazin-Puffer
0.05 ml NAD-Lösung (40 mg/ml)

Nacheinander zupitettieren :

0.02 ml MDH-Lösung (2.5 mg/ml = 5000 E/ml)
0.02 ml GDH-Lösung (2.5 mg/ml = 5000 E/ml)
0.02 ml LDH-Lösung (2.5 mg/ml = 5000 E/ml)

b). Bestimmung von Dihydroxyacetonphosphat, Fructose-1.6-diphosphat und Pyruvat (30, 35, 41).

Reaktion:

$$DAP + NADH + H^+ \xrightarrow{GDH} \alpha\text{-GP} + NAD^+$$

$$FDP \xrightarrow{ALD} DAP + GAP$$

$$GAP \xrightarrow{TIM} DAP$$

$$2\ DAP + 2\ NADH + 2\ H^+ \xrightarrow{GDH} 2\ \alpha\text{-GP} + 2\ NAD^+$$

$$Pyruvat + NADH + 2\ H^+ \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^+$$

Testzusammensetzung:

2.0 ml 0.1 N Tra-Puffer, pH 7.6, mit 0.01 N EDTA

3.0 ml Gewebsextrakt

0.01 ml NADH (8 mg/ml)

Nacheinander zupitettieren:

0.01 ml GDH (2.5 mg/ml = 5000 E/ml)

0.02 ml ALD/TIM (500 E/ml ALD + 65000 E/ml TIM)

0.005 ml LDH (2.5 mg/ml = 50 000 E/ml)

c). Bestimmung von Glucose-6-phosphat und Adenosintriphosphat im kombinierten Test (16, 35).

Reaktion:

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP^+ \xrightarrow{ZF} 6\text{-Phosphogluconat} + NADPH + H^+$$

$$ATP + Glucose \xrightarrow[(Mg)]{HK} G\text{-}6\text{-}P + ADP$$

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP^+ \xrightarrow{ZF} 6\text{-Phosphogluconat} + NADPH + H^+$$

Testzusammensetzung:

0.8 ml 0.1 N Tra-Puffer, pH 7.6

0.2 ml Gewebsextrakt

0.02 ml NADP-Lösung (20 mg/ml)

0.01 ml $MgCl_2$-Lösung (66 mg/ml)

Nacheinander zupitettieren:

0.01 ml ZF (0.5 mg/ml = 2000 E/ml)

0.02 ml Glucose (0.1 m)

0.01 ml HK (1 mg/ml = 8000 E/ml)

d). Bestimmung der "wahren" Glucose (36):

Reaktion:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow[(mg)]{HK} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + NADP^+ \xrightarrow{ZF} \text{6-Phosphogluconat} + NADPH + H^+$$

Testzusammensetzung:

0.9 ml 0.1 N Tra-Puffer, pH 7.6

0.2 ml Gewebsextrakt

0.02 ml NADP (20 mg/ml)

0.005 ml ATP (100 mg/ml)

0.01 ml $MgCl_2$ (66 mg/ml)

0.01 ml ZF (0.5 mg/ml = 2000 E/ml)

Zupitettieren:

0.01 ml HK (1 mg/ml = 8000 E/ml)

e). Bestimmung von Kreatin (40):

Reaktion:

$$C + ATP \xrightarrow{CPK} C - P + ADP$$

$$ADP + PEP \xrightarrow{PK} ATP + Pyruvat$$

$$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^+$$

Testzusammensetzung:

0.85 ml 0.1 N Tra-Puffer + 0.001 N Trilon
0.05 ml Gewebsextrakt
0.05 ml NADH (8 mg/ml)
0.05 ml PEP (15 mg/ml)
0.05 ml ATP (100 mg/ml)
0.01 ml $MgCl_2$ (66 mg/ml)
0.015 ml LDH (2.5 mg/ml = 50 000 E/ml)
0.005 ml PK (10 mg/ml)

Zupitettieren:

0.02 ml CPK (20 mg/ml Glykokollpuffer, pH 9.0)

f). Bestimmung von Kreatinphosphat (26):

Reaktion:

$$C\text{-}P + ADP \xrightarrow{CPK} C + ATP$$

$$ATP + Glucose \xrightarrow[(Mg)]{HK} G\text{-}6\text{-}P + ADP$$

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP^+ \xrightarrow{ZF} 6\text{-Phosphogluconat} + NADH + H^+$$

Testzusammensetzung:

0.85 ml 0.1 N Tra-Puffer + 0.001 N Trilon
0.01 ml Gewebsextrakt
0.01 ml $MgCl_2$ (66 mg/ml)
0.04 ml NADP (20 mg/ml)
0.01 ml ZF (0.5 mg/ml = 2000 E/ml)
0.02 ml Glucose (6×10^{-2} M)
0.01 ml HK (1 mg/ml = 8000 E/ml)
0.005 ml ADP (62 mg/ml)

Zupitettieren:

0.02 ml CPK (20 mg/ml Glykokollpuffer, pH 9.0)

g). Bestimmung von Adenosinmono- und diphosphat im kombinierten Test (1, 16):

Reaktion:

$$ADP + PEP \xrightarrow[(Mg)]{PK} Pyruvat + ATP$$

$$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^+$$

$$AMP + ATP \xrightarrow{MK} 2\ ADP$$

Testzusammensetzung:

0.8 ml 0.1 N Tra-Puffer + 0.001 N Trilon
0.2 ml Gewebsextrakt
0.01 ml $MgCl_2$ (66 mg/ml)
0.02 ml NADH (8 mg/ml)
0.02 ml PEP (15 mg/ml)
0.01 ml LDH (2.5 mg/ml = 5000 E/ml)

Nacheinander zupitettieren:

0.005 ml PK (2 mg/ml = 5000 E/ml)

0.01 ml MK (5 mg/ml)

h). Bestimmung von Nicotinamid-adenin-dinucleotid (24, 31):

Reaktion:

$$\text{Äthanol} + NAD^+ \xrightarrow{ADH} \text{Acetaldehyd} + NADH + H^+$$

Testzusammensetzung:

0.45 ml 0.1 M Pyrophosphat-Puffer, pH 9.0

0.05 ml Äthanol (1 : 10 verdünnt)

0.50 ml Gewebsextrakt

Zupitettieren:

0.005 ml ADH (3 mg/ml)

i). Bestimmung von Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (25):

Reaktion:

$$\text{G-6-P} + NADP^+ \xrightarrow{ZF} \text{6-Phosphogluconat} + NADPH + H^+$$

Testzusammensetzung:

2.0 ml 0.1 N Tra-Puffer + 0.001 N Trilon

2.0 ml Gewebsextrakt

0.02 ml $MgCl_2$ (66 mg/ml)

0.04 ml G-6-P (31 mg/ml)

Zupitettieren:

0.02 ml ZF (5 mg/ml = 20 000 E/ml)

Küvette : d = 5 cm

k). Bestimmung von Phospho-enol-pyruvat (16):

Reaktion:

$$PEP + ADP \xrightarrow[(K)\ (Mg)]{PK} Pyruvat + ATP$$

$$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^+$$

Testzusammensetzung:

1. 9 ml Tra-Puffer, pH 7. 6
2. 5 ml Gewebsextrakt
0. 02 ml NADH (8 mg/ml)
0. 1 ml KCl (0. 25 M)
0. 1 ml $MgCl_2$ (66 mg/ml)
0. 4 ml ADP (0. 01 M)

Nacheinander zupipettieren:

0. 02 ml LDH (2. 5 mg/ml = 50 000 E/ml)
0. 005 ml PK (2 mg/ml = 5000 E/ml)

Küvette : d = 5 cm

l). Bestimmung von Oxalacetat (16):

Reaktion:

$$OAA + NADH + H^+ \xrightarrow{MDH} Malat + NAD^+$$

Testzusammensetzung:

2. 5 ml Tra-Puffer, pH 7. 6
2. 5 ml Gewebsextrakt
0. 005 ml NADH (8 mg/ml)

Zupipettieren:

0. 001 ml MDH (30 mg/ml = 6000 E/ml)

Messung im Photometer Beckman DK 1 bei maximaler Skalenexpansion; Küvette : d = 5 cm. OAA muß direkt nach Extraktbereitung gemessen werden.

m). Bestimmung von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (24):

Reaktion:

$$NADH + H^+ + \text{Pyruvat} \xrightarrow{LDH} NAD^+ + \text{Lactat}$$

Vorbereitung des Extraktes : NADH wird mit Alkali aus dem Gewebe extrahiert.

Testzusammensetzung:

4.00 ml Extrakt
0.01 ml Pyruvat (1 M)

Zupitettieren:

0.01 ml LDH (2.5 mg/ml = 50 000 E/ml)

Messung bei maximaler Skalenspreizung im Photometer Beckman DK 1, λ = 340 nm, Küvette d = 5 cm.

n). Bestimmung von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (25):

Reaktion:

$$\alpha\text{-KG} + NH_4^+ + NADPH \longrightarrow \text{Glutamat} + NADP^+$$

Vorbereitung des Extraktes : NADPH wird mit Alkali aus dem Gewebe extrahiert.

Testzusammensetzung:

4.0 ml Extrakt

0.01 ml Pyruvat (1 M)

0.01 ml α-KG (0.5 M)

0.01 ml NH_4Cl (1 M)

Zupipettieren:

0.01 ml LDH (2.5 mg/ml = 50 000 E/ml)

0.01 ml GluDH

Messung bei maximaler Skalenspreizung im Photometer Beckman DK 1; λ = 340 nm, Küvette d = 5 cm.

o). Bestimmung von Glykogen(6):

Aufbereitung des Gewebes:

Das nach der Frierstopmethode gewonnene Gewebepulver wird in 2 ml 30 %ige Kalilauge eingewogen und 15 min. im kochenden Wasserbad stehengelassen. Das Hydrolysat wird zweimal mit Äthanol gefällt und zentrifugiert. Den Rückstand nimmt man in 2 ml 2 N Schwefelsäure auf und kocht 90 min. im Wasserbad. Nach Neutralisation mit 2 M Natriumcarbonat-Lösung gegen Methylorange als Indikator wird auf 25 ml aufgefüllt und die gebildete Glucose wie unter III. 4.d. beschrieben bestimmt.

III. 5. Bestimmung der Proteine

Die quantitative Bestimmung des löslichen Extraktproteins erfolgt nach der Kjeldahl-Methode.

IV. DISKUSSION

Während die spezifische Funktion des braunen Fettgewebes bei Winterschläfern oder neugeborenen Säugetieren im allgemeinen im Zusammenhang mit der zusätzlichen chemischen Wärmebildung nach Kältebelastung bzw. während der verschiedenen Aufwachperioden nach dem Winterschlaf gebracht wird (2, 4, 37) und dieser Zusammenhang bereits gesichert ist, ist der Mechanismus dieser Wärmebildung noch weitgehend ungeklärt . SMITH et al. (37) diskutierten als erste auf Grund der hohen Kapazität der mitochondrialen α-Glycerophosphat-Oxydase im braunen Fettgewebe, daß α-Glycerophosphat das eigentliche Substrat der mitochondrialen Wärmeproduktion sei (38).
Offensichtlich steht diese Annahme im Widerspruch zu dem Befund, daß während Kältebelastung vor allem Fett oxydiert wird, was unter anderem an der starken Glycerinfreisetzung in das Blut bei geringer Fettsäureausschüttung (12) und am niedrigen respiratorischen Quotienten während der Thermogenese (4) zu erkennen ist. Auch würde die im Vergleich zu anderen Substraten der Glycolyse oder des Citrat-Cyclus verminderte Phosphorylierungsausbeute - bei der Veratmung von Glycerophosphat werden nur zwei ATP pro Mol erzeugt - für die Lieferung der in vivo bestimmten Wärmeäquivalente keineswegs ausreichen.

Der Unterschied im Reduktionszustand zwischen den beiden NADH/NAD gekoppelten Redox-Systemen Lactat/Pyruvat und α-Glycerophosphat/Dihydroxyacetonphosphat mit deutlich stärkerer Oxydation des letzteren kann möglicherweise, insbesondere angesichts der hohen α-Glycerophosphat-Aktivität, im Zusammenhang mit dem Wasserstofftransport vom Cytosol an die mitochondriale Atmungskette, den sog. Bücher-Cyclus, diskutiert werden.

Dagegen spricht, daß während der postnatalen Entwicklung, die auch von einem erheblichen Schwund von α-Glycerophosphatoxydase-Aktivität begleitet ist (32, 39), der Unterschied im Reduktionszustand zwischen diesen beiden Redox-Systemen bestehen bleibt, so daß auch hier die Frage der unterschiedlichen Verteilung beider Redox-Systeme im Cytosol als Ursache der verschiedenen Reduktionszustandes in Betracht gezogen werden müssen, in Analogie zu den Verhältnissen beispielsweise im Muskel (19).

Entgegen den Untersuchungen von LINDBERG (27) und SMITH (38) konnten HOHORST et al. (21, 32, 39) zeigen, daß Mitochondrien aus braunem Fett neugeborener Meerschweinchen unter gewissen Bedingungen doch zur vollen Atmungskontrolle mit ADP und hohen Phosphorylierungsanteilen befähigt sind. Es wurde damit wahrscheinlich, daß braune Fettmitochondrien die Kapazität zur oxydativen Phosphorylierung haben, aber unter den Bedingungen der chemischen Wärmeproduktion, d. h. nach Kältebelastung, unter dem Einfluß der aus den Fettspeichern freigesetzten langkettigen Fettsäuren entkoppelt werden. Ebenso ist eine Rückkoppelung möglich, und zwar entweder durch Zugabe von ATP oder aber besonders gut von GTP sowie GDP plus α-Ketoglutarat. Die dafür benötigten Konzentrationen betragen für Guanosintriphosphat 2 mMol/1, für Guanosindiphosphat nur etwa 1/20 davon, was darauf hinweist, daß das eigentliche für die Rückkoppelung verantwortliche Agens intramitochondriales Guanosintriphosphat ist. Die mit der Ionenaustauscherchromatographie ermittelten Guanosintriphosphatgehalte des Braunen Fettes liegen mit 0.05 µM/g etwa in der gleichen Größenordnung, insbesondere wenn man berücksichtigt, daß die wirksame Konzentration im Cytosol der braunen Fettzellen sicherlich höher liegt als der Zahlenwert bezogen auf g frisch-Basis. Dabei ist die Frage einer Compartmentierung bzw. der räumlichen intracellulären Verteilung der Guanosinphosphate, über die einstweilen noch keine Aussagen möglich sind, unberücksichtigt.

Auch über die Nucleotidspezifität der Restitution der Atmungskettenphosphorylierung sind sichere Aussagen erst dann möglich, wenn der Mechanismus bekannt ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß insbesondere der schnellere Rückkoppelungseffekt der Guanosinnucleotide im wesentlichen eine Frage der Nucleotidpermeabilität durch die Mitochondrienmembran darstellt.
Der auffallend hohe relative Gehalt des braunen Fettgewebes an Cytosinmonophosphat ist möglicherweise ein Indikator für einen starken Phospholipidstoffwechsel, wie er insbesondere zum Aufbau der Mitochondrienmembranen in diesem sehr mitochondrienreichen Gewebe benötigt wird.
Sowohl die Metabolitanalysen dieser Arbeit als auch das Enzymspektrum des braunen Fettgewebes (14) zeigen, daß dieses Gewebe trotz seiner Spezialisierung auf die Fettsäureoxydation im Zusammenhang mit der chemischen Wärmebildung über ein voll vorhandenes glycolytisches System verfügt. Ein für die braunen Fettzellen spezifisches Enzym- oder Metabolitmuster war auf Grund der vergleichenden Analyse während der postnatalen Entwicklung des braunen Fetts zum weißen Fett nicht zu erkennen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe einer Mikromethode zur Anionenaustauscher-Chromatographie von freien säurelöslichen Nucleotiden, welche eine Trennung innerhalb von 12 Stunden bei einer Nachweisgrenze von 1/100 Mikromol pro Nucleotid gestattet, wurde das Nucleotid-Verteilungsmuster des interscapularen "braunen" Fettgewebes beim Meerschweinchen bestimmt. Erfaßt wurden die säurelöslichen Nucleotide AMP, ADP, ATP, GMP, GTP, UMP, UTP, CMP, NAD und NADP. Alle übrigen Nucleotide entziehen sich, falls überhaupt vorhanden, dem Nachweis.

Beim neugeborenen Meerschweinchen unterscheidet sich das Nucleotid-Verteilungsmuster im interscapularen braunen Fettgewebe von dem anderer Gewebe vor allem durch seinen hohen CMP-Gehalt. Bei der frühen postnatalen Involution bei Aufzucht der Tiere bei Zimmertemperatur kommt es zu einem proportionalen Abfall aller Nucleotide, der dem Schwund des löslichen Extraktproteins parallel geht. Trotz der beträchtlichen morphologischen und funktionellen Unterschiede zwischen braunem Fett neugeborener und 20 Tage alter Meerschweinchen waren charakteristische Veränderungen des Nucleotidmusters bei der Involution nicht nachzuweisen.

Bei Kälteadaptation durch Aufzucht der Tiere bei 5°C von Geburt an ist der Abfall geringer als bei der entsprechenden Aufzucht in Wärme (23°C). Ebenso steigen die vorher abgefallenen Nucleotid-Gehalte bei Tieren, die zunächst 7 Wochen bei 23°C und anschließend weitere 7 Wochen bei 5°C gehalten wurden, wieder auf Werte an, die sich dem Neugeborenenstatus nähern. Auch dieses Verhalten entspricht den morphologischen Ergebnissen, da Kältebelastung die postnatale Involution mit Umwandlung der plurivacuolären "braunen" Fettzellen in univacuoläre "weiße" Fettzellen weitgehend aufhält.

Ein Vergleich des Nucleotid-Verteilungsmusters des interscapularen "braunen" Fettgewebes mit dem epididymalen "weißen" Fett erwachsener Meerschweinchen zeigt lediglich, daß die Spiegel aller Nucleotide gleichmäßig niedriger liegen. Charakteristische Unterschiede im Gehalt einzelner Nucleotide sind auch hier nicht zu erkennen.
Anders als bei den Nucleotiden ist bei den Metaboliten des Energiestoffwechsels zusätzlich zur allgemeinen durch den Schwund des Protoplasmaanteils während der postnatalen Involution des Fettkörpers bedingten Verminderung der Spiegel eine Differenzierung zwischen einzelnen Metabolit-Gruppen zu erkennen. Insbesondere Glucose, Malat und das Redox-Paar Lactat/Pyruvat steigen während der postnatalen Entwicklung relativ an. Der Anstieg von Malat und Lactat ist nicht durch eine verstärkte Reduktion des extramitochondrialen NAD/NADH-Systems bedingt. Auffallend ist, daß das dritte NAD/NADH abhängige Redox-System α-Glycerophosphat/Dihydroxyacetonphosphat im Vergleich zu Lactat/Pyruvat und Malat/Oxalacetat auf deutlich positiverem Redox-Potential steht, was im Zusammenhang mit der hohen Aktivität der mitochondrialen α-Glycerophosphat-Oxydase diskutiert wird.
Zusätzlich zu den Metaboliten des Embden-Meyerhof-Systems wurden auch Creatinphosphat und Creatin nachgewiesen.

Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der Frage besprochen, ob aus den Mustern der freien Nucleotide und der Metabolite des Energiestoffwechsels charakteristische Unterschiede zwischen dem plurivacuolären "braunen" Fett des Neugeborenen bzw. kälteadaptierten und den unilokulären "weißen" Fettzellen des in Wärme aufgezogenen Meerschweinchens bestehen.

VI. ABKÜRZUNGEN

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-diphosphat
ALD	Aldolase
AMP	Adenosin-monophosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
C	Kreatin
CDP	Cytidin-diphosphat
CMP	Cytidin-monophosphat
CP	Kreatin-phosphat
CPK	Kreatin-phospho-Kinase
CTP	Cytidin-triphosphat
DAP	Dihydroxyaceton-phosphat
FDP	Fructose-1.6-diphosphat
GDH	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-diphosphat
Glu	Glucose
Glu-DH	Glutamat-Dehydrogenase
Gly	Glycogen
GMP	Guanosin-monophosphat
α-GP	α-Glycerophosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
GTP	Guanosin-triphosphat
HK	Hexokinase
α-KG	α-Ketoglutarat
L/P	Lactat/Pyruvat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Malat
MDH	Malat-Dehydrogenase
MK	Myo-Kinase
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduz.
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat reduz.
OAA	Oxalacetat
P	Phosphor
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat-Kinase
TIM	Triose-Isomerase
Tra-Puffer	Triaethanolamin/HCl-Puffer
UDP	Uridin-diphosphat
UMP	Uridin-monophosphat
UTP	Uridin-triphosphat
ZF	Zwischenferment, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1). Adam, H.;
"Nukleotidspezifität glykolytischer Kinasen; enzymatische Bestimmung des Adenylsäuresystems".
Biochem. Z. 335, 25 (1961)

2). Brück, K.;
"Die Bedeutung des braunen Fettgewebes für die Temperaturregelung des neugeborenen und kälteadaptierten Säugers".
Naturwissenschaften, 7, 156 (1967)

3). Brück, K. und B. Wünnenberg;
"Untersuchungen über die Bedeutung des multilokulären Fettgewebes für die Thermogenese des neugeborenen Meerschweinchens".
Pflügers Arch. ges. Physiol. 282, 1 (1965)

4). Brück, K. und B. Wünnenberg;
"Über die Modi der Thermogenese beim neugeborenen Warmblüter (Meerschweinchen)".
Pflügers Arch. ges. Physiol. 282, 362 (1965)

5). Brück, K. und B. Wünnenberg;
"Blockade der chemischen Thermogenese und Auslösung von Muskelzittern durch Adrenolytica und Ganglienblockade beim neugeborenen Meerschweinchen".
Pflügers Arch. ges. Physiol. 282, 376 (1965)

6). Carrol, N.V., R.W. Longley and J.H. Roe;
"The Determination Of Glycogen In Liver And Muscle By Use Of Anthrone Reagent".
J. biol. Chem. 220, 583 (1956)

7). Chaffee, R. R. J., J. R. Allen, Y. Cassuto and R. E. Smith;
"Biochemistry Of Brown Fat and Liver Of Cold-acclimated Hamsters".
Amer. J. Physiol. 207, 1211 (1964)

8). Chalvardjian, A. M.;
"Fatty Acids Of Brown And Yellow Fat in Rats".
Biochem. J. 90, 518 (1964)

9). Dawkins, M. J. R. and D. Hull;
"Brown Adipose Tissue And The Response Of New-born Rabbits To Cold".
J. Physiol., Lond. 172, 216 (1964)

10). Dettinger, E., C. Hirschhäuser, G. Schneider und H. J. Hohorst;
unveröffentlicht.

11). Gressner, C.;
Medici Tigurini Historiae animalium (1551), pp. 840 - 843
cit. by Bole jr., G. G., B. L. Baker, D. J. Ingle and Ch. H. Li.
Univ. Michigan Med. Bull. 17, 413 (1951)

12). Heim, T. and D. Hull;
"Blood Flow In Brown Adipose Tissue".
J. Physiol., Lond. 181, 60 P (1965)

13). Heldt, H. W.;
"Phosphathaltige Metabolite in Anionenaustauscherchromatogrammen säurelöslicher Extrakte aus Rattenleber im Nano-Bereich".
Biochem. Z. 337, 397 (1963)

14). Hirschhäuser, C.;
"Enzymgehalte des "braunen" interscapularen Fettkörpers des Meerschweinchens während der frühen postnatalen Periode".

15). Hohorst, H. J. ;
"Enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure".
Biochem. Z. 328, 509 (1957)

16). Hohorst, H. J., F. Kreutz und Th. Bücher ;
"Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der Leber der Ratte".
Biochem. Z. 332, 18 (1959)

17). Hohorst, H. J. ;
"Der Reduktionszustand des Diphosphopyridin-Nukleotidsystems in lebendem Gewebe. Eine Studie über Metabolitgleichgewichte in der Rattenleberzelle".
Natw. Diss. Marburg (1960)

18). Hohorst, H. J. ;
"Metabolitgehalte und Metabolitgleichgewichte in der quergestreiften Muskulatur der Ratte".
Habilitationsschrift Marburg (1962)

19). Hohorst, H. J. ;
"Einige Bemerkungen über Metabolitgleichgewichte und Strukturen im cytoplasmatischen Lösungsraum".
Wiss. Konfer. d. Ges. deutsch. Naturforscher und Ärzte, Rottach-Egern 1962 (Springer-Verlag 1962)

20). Hohorst, H. J., C. Hirschhäuser, E. Dettinger und M. Sonneborn;
"Enzyme des braunen Fettgewebes : Postnatale Involution und Kälteadaptation".
Abstr. 39, Tagung d. Ges. f. Physiol. Chem., Berlin (1965)

21). Hohorst, H. J., und J. Rafael ;
"Oxydative Phosphorylierung durch Mitochondrien aus braunem Fett ".
Z. Physiol. Chem. 349, 268 (1968)

22). Kirsten, E., R. Kirsten und P. Arese ;
"Das Verhalten von freien Aminosäuren, energiereichen Phosphorsäureverbindungen und einigen Glykolyse- und Tricarbonsäurecyclus-Substraten in Muskeln von Locusta migratoria bei der Arbeit".
Biochem. Z. 337, 167 (1963)

23). Klingenberg, M. ;
"Pyridinnucleotide und biologische Oxydation".
11. Coll. d. Ges. f. Physiol. Chem., Mosbach 1960
(Springer Verlag 1961)

24). Klingenberg, M. ;
"Diphospho-pyridinnucleotid"
pp. 528 in Bergmeyer, H. U. ; "Methoden der enzymatischen Analyse". (Verlag Chemie 1962)

25). Klingenberg, M. ;
"Triphospho-pyridinnucleotid"
pp. 535 in Bergmeyer, H. U. ; "Methoden der enzymatischen Analyse ". (Verlag Chemie 1962)

26). Lamprecht, W., und P. Stein ;
"Creatinphosphat "
pp. 610 in Bergmeyer, H. U. ; "Methoden der enzymatischen Analyse ". (Verlag Chemie 1962).

27). Lindberg, O., J. De Pierre, E. Rylander and B. A. Afzelius ;
"Studies Of The Mitochondrial Energy Transfer System Of Brown Adipose Tissue".
J. Cell Biol. 34, 293 (1967).

28). Mandel, P. ;
"Free Nucleotides In Animal Tissues".
Progr. Nucleic Acid Res. 3, 307 (1964)

29). Pagé, E., and L. M. Babineau ;
"The Effect Of Cold Invironment On The Hibernating Gland Of The Rat ".
Rec. canad. Biol. 9, 202 (1950)

30). Racker, E. ;
"Spectrophotometric Measurement Of Hexokinase And Phosphohexokinase Activity."
J. biol. Chem. 167, 843 (1947)

31). Racker, E. ;
"Crystalline Alcoholdehydrogenase From Baker's Yeast".
J. biol. Chem. 184, 313 (1950)

32). Rafael, J., D. Klaas und H. J. Hohorst ;
"Mitochondrien aus braunem Fettgewebe : Enzyme und Atmungskettenphosphorylierung während der prä- und postnatalen Entwicklung des interscapularen Fettkörpers des Meerschweinchens".
Z. Physiol. Chem. 349, 1711 (1968)

33). Saukonnen, J. J. ;
"Über das Vorkommen von freien Nucleotiden in ruhenden und wachsenden Geweben".
med. Diss. Helsinki (1956)

34). Schmahl, F.W., E. Betz, H. Talke und H. J. Hohorst;
"Energiereiche Phosphate und Metabolite des Energiestoffwechsels in der Großhirnrinde der Katze".
Biochem. Z. 342, 518 (1965)

35). Slater, E. C.;
"Spectrophotometric Determination Of Fructose-1. 6-di-phosphate, Hexosemonophosphate, Adenosintriphosphate And Adenosindiphosphate".
Biochem. J. 53, 157 (1953)

36). Slein, M. W.;
"D-Glucose. Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phos-phat-Dehydrogenase".
pp. 117 in Bergmeyer, H. U.; "Methoden der enzymatischen Analyse" (Verlag Chemie 1962)

37). Smith, R. E., and J. C. Roberts;
"Thermogenesis Of Brown Adipose Tissue In Cold-acclimated Rats".
Amer. J. Physiol. 206, 143 (1964)

38). Smith, R. E., J. C. Roberts and K. J. Hittelman;
"Nonphosphorylating Respiration Of Mitochondria From Brown Adipose Tissue Of Rats".
Science 154, 653 (1966)

39). Stratmann, D., and H. J. Hohorst;
"Mitochondria Of Brown Adipose Tissue : Involution and Cold Adaption".
Abstr. 434, IV. FEBS meeting, Oslo (1967)

40). Tanzer, M.L., and C. Gilvarg ;
"Creatine And Creatine Kinase Measurement ".
J. biol. Chem. 234, 3201 (1959)

41). Thorn, W., G. Pfleiderer, R.A. Frowein und J. Ross ;
"Stoffwechselvorgänge imGehirn bei akuter Anoxie, akuter Ischämie und in der Erholung".
Pflügers Arch. ges. Physiol. 261, 334 (1955)

42). Warburg. O.;
"Chemische Konstitution von Fermenten ".
Ergebn. Enzymforsch. 7, 210 (1938)

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn waren die Herren Professoren und Dozenten :

Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Bücher, Buchholz, Dimroth, Drawert, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Hornung, Jacob, Lang, Linneweh, Löhr, Mahr, Mann, Martini, Marx, Maurath, Petry, Rodeck, Rohen, Sauer, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Stender, Straub, Streicher, Süsse, Vogell, Vogt, Walcher und Würtele.

Lebenslauf:

Am 28. September 1940 wurde ich als zweites Kind des Vermessungsobersteigers Erich Palm und seiner Ehefrau Helene, geb. Mismahl, in Oberhausen/Rhld. geboren.
In Mülheim-Ruhr wurde ich Ostern 1957 in die Volksschule eingeschult. Seit Ostern 1951 besuchte ich die Mädchenrealschule in Mülheim/Ruhr, von der ich Ostern 1955 auf das Neusprachliche Mädchengymnasium der Städt. "Luisenschule" wechselte, wo ich am 8. März 1960 die Reifeprüfung bestand.
Zum SS 1960 wurde ich an der Philosophischen Fakultät der Philipps-Universität in Marburg für die Fächer Mathematik und Biologie immatrikuliert. Vom Wintersemester 1060/61 an studierte ich Medizin.
Am 22. April 1963 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und am 2. September 1966 die ärztliche Prüfung.
Vom 1. Mai 1965 bis zum 30. April 1966 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität in Marburg tätig.
Seit dem 1. November 1966 bin ich mit 10-monatiger Unterbrechung am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität in Marburg an der Lahn und am St. Marienhospital in Mülheim/Ruhr als Medizinalassistentin beschäftigt.

Am 22. Oktober 1965 heiratete ich den Diplom-Chemiker Manfred Sonneborn aus Marburg an der Lahn.